

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification⁶ : C07K 14/78, A61K 38/39	A1	(11) International Publication Number: WO 99/10381 (43) International Publication Date: 4 March 1999 (04.03.99)
(21) International Application Number: PCT/US98/14284 (22) International Filing Date: 9 July 1998 (09.07.98) (30) Priority Data: 08/918,223 25 August 1997 (25.08.97) US (71) Applicant: WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 614 Walnut Street, Madison, WI 53705 (US). (72) Inventor: RAINES, Ronald, T.; 2320 Lakeland Avenue, Madison, WI 53704-5735 (US). (74) Agent: BAKER, Jean, C.; Quarles & Brady, 411 East Wisconsin Avenue, Milwaukee, WI 53202-4497 (US).	(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>	
(54) Title: COLLAGEN MIMICS (57) Abstract <p>A novel collagen mimic comprising a tripeptide unit having the formula (XaaFlpGly)_n, where Flp is 4(R)-fluoro-L-proline, is disclosed. The collagen mimic has increased stability relative to the collagen-related triple helices (ProProGly)_n and (ProHypGly)_n.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroun	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-514189
(P2001-514189A)

(43) 公表日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	チーコード ⁷ (参考)
C 0 7 K 14/78		C 0 7 K 14/78	4 C 0 8 1
A 6 1 K 38/17		A 6 1 L 27/00	C 4 C 0 8 4
A 6 1 L 27/00		A 6 1 K 37/12	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2000-507706(P2000-507706)
 (86) (22) 出願日 平成10年7月9日 (1998.7.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年2月24日 (2000.2.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US98/14284
 (87) 国際公開番号 WO99/10381
 (87) 国際公開日 平成11年3月4日 (1999.3.4)
 (31) 優先権主張番号 08/918, 223
 (32) 優先日 平成9年8月25日 (1997.8.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ウィスコンシン アラムニ リサーチ フ
 アンデーション
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州
 53705 マディソン ウォルナット スト
 リート 614
 (72) 発明者 レインズ ロナルド ティー
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州
 53704-5735 マディソン レイクランド
 アベニュー 2320
 (74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン擬似物

(57) 【要約】

式 (XaaF1pGly)。 (式中、F1pは4 (R)
 -フルオロ-L-プロリンである) を有するトリペプチ
 ド単位を含む新規なコラーゲン擬似体。このコラーゲン
 擬似体は、コラーゲン関連三重螺旋 (ProProGly)
 y) 及び (ProHypGly) に関連して安定性を
 増加させた。

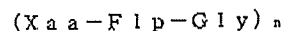
(2)

特表2001-514189

【特許請求の範囲】

【請求項1】式：

【化1】



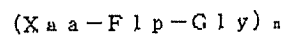
(式中、Xaaは任意のアミノ酸残基であり、Flpは4(R)-フルオロプロリンであり、nは正の整数である)を有するトリペプチドを含む事を特徴とするコラーゲン擬似物。

【請求項2】nが少なくとも7である、請求項1に記載のコラーゲン擬似物。

【請求項3】少なくとも一種のアミノ酸残基Xaaがプロリン残基である、請求項1に記載のコラーゲン擬似物。

【請求項4】コラーゲン擬態分子の三重螺旋を含む組成物であって、該螺旋中のそれぞれの分子が、式：

【化2】



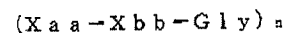
(式中、Xaaは任意の天然のアミノ酸であり、Flpは4(R)-フルオロプロリンであり、nは正の整数である)のトリペプチドを含む事を特徴とする組成物。

【請求項5】nが少なくとも7である、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】Xaaがプロリンである、請求項4に記載の組成物。

【請求項7】式：

【化3】



(式中、Xaaは任意のアミノ酸残基であり、Xbbは、4(R)-フルオロプロリン、アセチル変性ヒドロキシプロリン、メシル変性ヒドロキシプロリン及びトリフルオロメチル変性ヒドロキシプロリンから成る群から選ばれ、nは正の整数である)を有するトリペプチドを含む事を特徴とするコラーゲン擬似物。

【請求項8】nが少なくとも7である、請求項7に記載のコラーゲン擬似物。

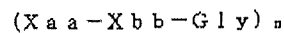
【請求項9】少なくとも一種のアミノ酸残基Xaaがプロリン残基である、請求項7に記載のコラーゲン擬似物。

(3)

特表2001-514189

【請求項10】式：

【化4】



(式中、 X_{aa} は、任意のアミノ酸残基であり、 X_{bb} は、4(R)-フルオロプロリン、4(S)-フルオロプロリン及び4,4-ジフルオロプロリンから成る群から選ばれ、 n は正の整数である)を有するトリペプチドを含む事を特徴とするコラーゲン擬似物。

【請求項11】 n が少なくとも7である、請求項10に記載のコラーゲン擬似物。

【請求項12】少なくとも一種のアミノ酸残基 X_{aa} がプロリン残基である、請求項10に記載のコラーゲン擬似物。

(4)

特表2001-514189

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、国民健康協会(National Institutes of Health)によって授与された助成金AR 4 4 2 7 6に基づく政府援助と、ホルムグレン博士(Dr. Steven K. Holmgren)に授与された、関節炎基金学位取得後の奨学金によって為されたものである。米国政府は、この発明に就いて一定の権利を有するものである。

【従来の技術】

コラーゲンは、皮膚、腱、骨、血管、軟骨、靱帯及び歯を含む殆ど全ての組織中に存在する、脊椎動物において最も豊富なタンパク質である。コラーゲンは、脊椎動物の組織の為の基本的構造タンパク質として貢献する。コラーゲン異常は、関節炎、リウマチ、脆弱骨、アテローム性動脈硬化症、肝硬変及び目の白内障を含めて、広範囲の人間の病気に関係している。又、コラーゲンは、傷の治療にとって極めて重要なものである。コラーゲンの構造及びその構造がその安定性に如何に影響を及ぼすかについての理解が進み、コラーゲンに関する病気の為の新たな治療法及び改善された傷口治療の開発を促進させた。

【0002】

コラーゲンは線維性タンパク質であり、様々な関連形態で存在する事が出来る。哺乳類は、コラーゲンの少なくとも10の変異体を形成する為に結合する少なくとも17の異なるポリペプチド鎖を産生する。これらの変異体のそれぞれにおいて、コラーゲンのポリペプチド鎖は、X-Y-Q1y配列(ここで、Xはしばしばプロリン(Pro)残基であり、Yはしばしば4(R)-ヒドロキシプロリン(Hyp)残基である)の凡そ300の繰返しから成る。結合組織(例えば、骨、腱、軟骨、靱帯、皮膚、血管及び歯)では、個々のコラーゲン分子は、密接した三重螺旋中で一緒に傷付けられる。これらの螺旋は、大きな引張り力の原線維中に組織されている(Jones & Miller, J. Mol. Biol., 218:209-219 (1991))。配列を変化させる事及びコラーゲン原線維を交叉させる事が、脊椎動物を、一次元(腱)、二次元(皮膚)又は三次元(軟骨)で応力を支える事が出来る様にしている。

(5)

特表2001-514189

脊椎動物では、コラーゲンポリペプチドは、 ProProGly の一般的な繰返し基調で移される。次いで、生体内で、コラーゲン生体合成の後で、鎖が三重螺旋の形成を始める前に Pro 残基のヒドロキシル化が酵素的に行われる。この様に、ヒドロキシル化は、コラーゲンの畳み込み及びコラーゲンの安定性の両方にとって重要なものとなり得る。 Hyp 残基のヒドロキシル基は、長い間、三重螺旋コラーゲンの熱安定性を増加させる事が知られている(Berg and Prockop, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 52:115-120 (1973))。例えば、 $(\text{ProHypGly})_{10}$ 鎖の三重螺旋の溶融温度は、 58°C であり、一方、 $(\text{ProProGly})_{10}$ 鎖の三重螺旋の溶融温度は 24°C に過ぎない(Sakakibara et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 303:198-202 (1973))。更に、 $(\text{ProHypGly})_{10}$ 鎖が三重螺旋中に畳み込まれる時の速度は、相当する $(\text{ProProGly})_{10}$ 鎖の速度よりも実質的に大きい(Chopra and Ananthanarayanan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7180-7184(1982))。然しながら、これらの観察された効果に対する分子基準は明らかではない。

【0003】

三重螺旋コラーゲンの構造と配座エネルギー計算を基にした分子のモデル化は、水素結合が、 Hyp 残基のヒドロキシル基と、同じ三重螺旋中のコラーゲン分子の主鎖基との間では形成出来ない事を示している(Okuyama et al., *J. Mol. Biol.*, 152:427-443 (1981))。幾つかのモデルは、ヒドロキシプロリンが、ヒドロキシル基と主鎖カルボニル基との間に形成される水分子の架橋の結果としてコラーゲンの安定性を増加させると言う仮説を含んでいる。この仮説を進めている知見に就いての総説としては、Suzuki et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2:54-56 (1980)及びNemethy, in *Collagen*, published by CRC press (1988)を参照されたい。この参照はここに引用される。

然しながら、架橋水分子モデルとは一致しない実験的証明が存在する。例えば、 $(\text{ProProGly})_{10}$ と $(\text{ProHypGly})_{10}$ の三重螺旋は、1, 2-アプロパノジオール中で安定であり、 Hyp 残基はこれらの無水条件において更なる安定性を与える事が分かった(Engel et al., *Biopolymers*, 16:601-622 (1977))。この論文は、水分子が、 $(\text{ProHypGly})_{10}$ の付加された安定性の

(6)

特表2001-514189

役割を担っていない事を示している。更に、熱容量測定は、6個のG l y - X - Y単位当り2個以上の結合水を持つコラーゲンと一致しない(Hoeve and Kakivaya, J. Phys. Chem., 80:754-749 (1976)。従って、ヒドロキシプロリン残基がコラーゲン三重螺旋を安定にするメカニズムについての従来の決定的な証明は存在していない。

【0004】

コラーゲンの構造がその安定性に如何に貢献するかに就いてのより一層の理解は、改善された安定性を有するコラーゲン又はコラーゲン擬似物の設計を促進する。高安定性コラーゲンの置換えは、改善された傷治療の開発を進展させる事が出来る。

最近、組織エンジニアリング及び組織接合の開発を含めて、傷の治療において著しい進展があった。例えば、火傷の治療の為に自家上皮移植は、組織エンジニアリングにおける著しい進歩である。又、組織エンジニアリングは、その幾つかは基体として人間のコラーゲンを使用する人工皮膚の幾つかのタイプの開発をもたらした。然しながら、この治療に関する最大の問題は、手術中及び手術後の移植片の脆弱性である。

組織接合は傷治療技術であり、そこでは、傷の周囲の皮膚中のコラーゲンを熱的に変性させる為にレーザーが使用される。この傷は、コラーゲンの再生を許す事によって再アニールされる。大きな傷の場合は、傷の再アニールを有効ならしめる為に「詰物」(filler)又は結合物(solder)が必要となる。人間のアルブミンを含めて様々な材料がこの目的の為に結合物として使用されている。良い結合物は弾性があり、非免疫原性であり、隣接部位に在る元々のコラーゲンと相互反応が出来る事が好ましい。

【0005】

又、コラーゲンは、その他の様々な医学目的に使用される。例えば、コラーゲンは、人間の身体によって自然に劣化する事の出来る縫合に使用され、従って、縫合は除去し回収される必要が無い。コラーゲン縫合の設計で時々制約となる要因は、コラーゲン繊維の強度である。大きな強度を持つコラーゲン変異体又は擬似物は、この制約を取除く事によってその様なコラーゲン縫合の用途において手

(7)

特表2001-514189

助けとなる。

【発明が解決しようとする課題】

当該技術分野において必要とされるものは、組織接合における結合物、及び医療構成成分の設計での使用の為の一般的な用具として、人工皮膚として使用する為の安定性を増加した新規なコラーゲンである。

フルオロプロリン (F1p) は、RとSの立体異性体の両方が、ゴットライプ等(Gottlieb et al., Biochemistry, 4:11:2507-2531 (1965)によって合成された。ゴットライプ等は、二つの異性体がコラーゲン中に導入された事を主張したが、この主張は、タケウチ等(Takeuchi et al., Biochem. Biophys. Acta, 175:156-164 (1969)、タケウチ及びプロコップ(Takeuchi and Prockop, Biochem. Biophys. Acta, 175:142-155 (1969)及びウィットー及びプロコップ(Uitto and Prockop, Arch. Biochem. Biophys., 181:293-299)によって後に異議を唱えられた。F1pが、得られたコラーゲン分子中に少しでも導入された範囲に対してゴットライプ等は生体合成を使用したので、F1pは、幾つかのランダムなプロリン残基に代わってポリペプチド中にランダムに導入されたのであろう。勿論、F1pに対する特有なコドンが存在していない。又、このF1pは、このF1pが少しでも導入されていたとしても（これは極めて疑わしい）産生されたタンパク質の性質を更にランダム化する両方の立体異性体のラセミ混合物であった。その他にも、F1pを大きなポリペプチド中に導入する事無しに、F1pの化学的性質が研究されている(Gerig and McLeod, J. Am. Chem. Soc., 98:3970-3975 (1976))。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、天然のコラーゲン(native collagen)が形成するものよりも強力な三重螺旋を形成するコラーゲンの新規な変異体が設計された点に集約される。新規な変異体は、天然のコラーゲン中に正常に見出される三重反復の特徴的ヒドロキシプロリン残基を置換したフッ素化プロリン残基を含む。

本発明の目的は、組織接合での結合物として、或いは、高強度を必要とするその他の用途でのコラーゲンの代替として、人工皮膚の一成分として使用する事が

(8)

特表2001-514189

出来る新規な高安定性コラーゲン分子を提供する事である。

Hyp 残基によってコラーゲンに付加された付加的安定性の性質を証明する為の証拠が用意され、それによって、その安定性を付加するであろうその位置にその他の残基を設計する事を可能とさせる事が本発明の特徴である。

本発明は、増加した強度を有する新規なコラーゲン擬似物を特徴とし、その分子を造る事の出来る代替方法を開示するものである。

本発明のその他の目的、利点及び特徴は、明細書、図面及び請求の範囲のレビューによって明らかとなるであろう。

【0007】

ここに開示される実施例に導く研究は、コラーゲンの三次元構造と安定性に貢献する要因に就いてのより良い理解が、傷治癒での使用に対して改善された強度を有するコラーゲン変異体の設計と、コラーゲンに関連した病気に罹っている人の治療の開発を促進すると言う考えで開始されたものである。又、様々な目的の為に汎用強力コラーゲンを提供するものである。

この研究の基をなす仮説は、架橋水分子は、コラーゲンの安定性には顕著に貢献しないと言う信念であった。第一に、夫々のHyp 残基に対して一個以上の水分子を固定化する事は、莫大なエントロピーコストを誘発する。一個の水分子は4つの水素結合を形成する事が出来る。大量の水溶液では、これらの4つの水素結合は、それ自身易動性であるその他の水分子と共に形成される。反対に、コラーゲンの架橋水分子は、それらの水素結合の二つが、水分子に関して固定であるコラーゲンと一緒にいるので、極めて大きなエントロピー損失を被る。

第二に、コラーゲンの架橋水分子が、コラーゲンの安定性にとって確かに重要であるならば、それらは均質で、一つの水素結合パターンが支配しているものと思われる。然しながら、三重螺旋コラーゲンの高解像度三次元構造は、個々のHyp 残基が1、2、3又は4個の水分子に結合して、鎖間又は鎖間水素結合の不規則な複雑なネットワークを形成している事を示している(Bella et al., Science, 266:75-81 (1994))。この水素結合におけるこの不均一性及び複雑性は、架橋水分子がコラーゲンに対して安定性を与えるとする仮説と一致しない。

【0008】

(9)

特表2001-514189

【発明の実施の態様】

ここに、コラーゲンの配座及び安定性に就いての誘起効果の影響を基礎とするコラーゲンの安定性に対する代替的説明が提案される。結晶コラーゲン中のHyp残基は、異常な ϕ 又は ψ 結合角を持たない。然し、 ω 角（ペプチド結合の二面角である）は考慮に値する。プロリンペプチド結合のトランス異性体（即ち、 $\omega = 180^\circ$ を持つ異性体）は、シス異性体（即ち、 $\omega = 0^\circ$ を持つ異性体）よりも僅かに有利であるに過ぎない。結晶コラーゲンの構造によるが、三重螺旋コラーゲン中のペプチド結合の全てがトランス配座にある。

この仮説のテストを始める為に、電子ー引込み基が、如何にトランス：シス比に影響を及ぼすかを決定した。N-アセチルプロリンメチルエステル（AcProOMe）、N-アセチル-4（R）-ヒドロキシプロリンメチルエステル（AcHypOMe）及びN-アセチル-4（R）-フルオロプロリン（AcFlpOMe）が合成されて、トランス状態のそれらの性質が決定された（Eberhardt et al., J. Am. Chem. Soc., 118:12261-12266 (1996)）。トランス：シス比は、 $\text{AcProOMe} < \text{AcHypOMe} < \text{AcFlpOMe}$ （表1）の順に増加する事が分かった。トランス異性体は三重螺旋コラーゲンにおいて見出される唯一の異性体であるので、この順序は、Flp残基がHyp残基よりも三重螺旋コラーゲンを安定化する事、及びHyp残基がPro残基よりも三重螺旋コラーゲンを安定化する事を示している。

【0009】

トランス：シス比に関するこの効果の起源は、AcProOMe、AcHypOMe及びAcFlpOMeの結晶構造を決定する事によって探索された（Panask et al., Int. J. Pept. Protein Res., 44:262-269）。C γ -C δ 結合長さは、 $\text{AcProOMe} > \text{AcHypOMe} > \text{AcFlpOMe}$ （表1）の順に減少する事が分かった。この順序は、4-位の置換体がC γ -C δ 結合から離れる電子密度を引込む誘起効果と一致する。短いC γ -C δ 結合長さは、トランス異性体中の原子間の立体的衝突を減少させるが、シス異性体に関しては効果を持たない。Hyp残基のヒドロキシル基からの誘起効果は、コラーゲンの安定性についてHypの効果と一致する。又、HypとFlp残基の誘起効果の別の出現が、

(10)

特表2001-514189

パナシク等及びエバーハート等(Panasik et al. and Eberhardt et al.)によって見出された。類似の誘起効果は、4(S)-フルオロプロリン及び4,4-ジフルオロプロリンにおいても出現されるべきものである。

【0010】

【表1】

表1: AcProOMe、AcHypOMe及びAcFlpOMeの性質に関する誘起効果

	トランス:シス比	$\Delta\Delta G$	C γ -C δ 結合長さ
		(kcal/mol)	(Å)
AcProOMe	4.3	0	1.523
AcHypOMe	5.8	0.18	1.510
AcFlpOMe	6.2	0.22	1.508

この結果は、旋回が、Hyp残基のヒドロキシル基に向けて電子密度を引き寄せるその誘起効果によってコラーゲンの三重反復基調の中間位置にHypを配置した場合は、なお大きな誘起効果を示す置換体を有する残基は、天然のコラーゲンよりもなお強力なコラーゲン三重螺旋を形成出来なければならない事を示している。本発明はこの前提を基礎とし、ここに示されたデータはこの仮説を支持している。4(R)-フルオロプロリン(Flp)中のプロリンの4-位にあるフッ素原子の配置及び、以下に開示する様なコラーゲン三重螺旋中へのFlpの導入は、確かに、コラーゲンの三重螺旋形成の強度を増加させる。従って、改善されたコラーゲン擬似物の知的な設計が、先ず最初に可能となる。

【0011】

コラーゲンの安定性に関する誘起効果の役割をテストする為に、以下の実施例において詳細に記述される様にして、コラーゲン擬似物(Xaa-Flp-Gly)₁₀(式中、Flpは4(R)-フルオロL-プロリン)を合成した。Flp残基中では、フッ素原子は強力な誘起効果を課するけれども、水素結合は形成しない。(ProFlpGly)₁₀、(ProProGly)₁₀及び(ProHypGly)₁₀の熱的安定性及び螺旋性は、円偏光二色性を使用して決定された。コラーゲン擬似物(ProFlpGly)₁₀は、テストされた他の形態のいず

(11)

特表2001-514189

れよりも強力な、極めて安定な三重螺旋コラーゲンを形成する事が分かった。これは、コラーゲン擬似物 (ProFlpGly)₁₀ が、コラーゲン相溶性物質を造る為のコラーゲン擬似物として有用であると言うだけではなく、コラーゲン三重螺旋構造の形成における決定的要因が、その三重反復基調の中間位置にあるプロリン中の4-位における電子密度についての誘起効果である事を証明するものである。

その三重基調の最初の位置に在るその他のアミノ酸を有するコラーゲン擬似物の形態が、ここで考えられる。

本発明は、式 (XaaFlpGly)_n を有する三重反復基調ペプチドから成るコラーゲン擬似物である (式中、Flp は、4(R)-フルオロー-L-プロリンであり、n は正の整数であり、Xaa は、アミノ酸であるが、一般的には、20 の天然アミノ酸の一つである)。以下の実施例においては、合成され、テストされたコラーゲン擬似物は、Xaa 位置にプロリン残基を有している。プロリン以外のアミノ酸は、Xaa 位置において許容される事、天然コラーゲンは、プロリンがその位置におけるプロトタイプ残基であるにも拘わらず、Xaa 位置において広範囲のアミノ酸を有する事が予測される。Xaa 位置における残基は、同じである事も出来れば、単一分子に従って同一性を変える事が出来る。

【0012】

以下の実施例は、配列 (XaaFlpGly)_n を有するコラーゲンの化学的合成を開示するものである。本発明は、合成の形式に関わりなく、その配列を含む分子を包含する事を意図するものである。生体ポリマーを合成する当業者は、以下に開示の化学的合成の改良を使用してペプチドを造る事が出来る事が予測される。分子は、以下に開示する様に、直接合成によって製造出来る。又、分子は、未完成のコラーゲン形態 (ProProGly)_n の酵素的変性によって、或いは、完成したコラーゲン (ProHypGly)_n 中のHyp中のヒドロキシル基をフッ素原子で置換する事によって天然コラーゲン中のプロリンのフッ素化によって製造する事が出来る。

生体合成によってXaaFlpGlyトリペプチド反復を有するコラーゲン擬似物を得る事は現在不可能である。天然コラーゲンの化学的変性によって得られ

(12)

特表2001-514189

るコラーゲン擬似物は、本発明の精神と範囲の内にあるものである。

本発明の成功は、ヒドロキシプロリンのヒドロキシル基に関するフッ素の優れた電子引込み能力に依るものである。従って、ヒドロキシル基の電子引込み能力（ヒドロキシル基をフッ素原子で置換える事に対置される様な）を高める化学的変性はコラーゲンの安定性を高める事が期待される。その電子引込み能力を増加させるヒドロキシプロリンのヒドロキシル基に対する化学的変性は、安定性を増加したコラーゲン擬似物となる事が予測される。ヒドロキシプロリンのヒドロキシル基について提案された化学的定変性が以下に開示される。

【0013】

【実施例】

【実施例】 三重螺旋コラーゲンの定義された擬似物の合成

要するに、 $(\text{ProFlpGly})_{10}$ を、固相でのセグメント縮合によって合成した。 FmocProFlyGlyOH 単位は、Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis 2nd Ed., Springer-Verlag (1994) に記載されている標準溶液相方法によって、 Flp と市販の試薬から組立てられた。 Flp は、Panasik et al., Int. J. Pept. Protein Res., 44:262-269 (1994) 及び Eberhardt et al., J. Am. Chem. Soc., 118:12261-12266 (1996) に記載されている通りに製造した。三重螺旋コラーゲン擬似物の夫々の鎖に対して、10の FmocProFlpGlyOH 単位を、ABI 432A ペプチド合成剤を使用して Z-クロロトリチル樹脂に結合させた。切断されたペプチドは、Vydac C-18 逆相カラム上で HPLC によって精製した。 $(\text{ProProGly})_{10}$ 及び $(\text{ProHypGly})_{10}$ は、Peptides International 製である。三つの 30 量体全ては、HPLC 及び質量分析によって純度 90% 以上である事が決定された。

【0014】

更に詳しくは、コラーゲン擬似物は、 FmocX-Y-GlyOH （ここで、 Fmoc は N^{α} -9-フルオレニルメトキシカルボニルである）形態のトリペプチド単位を基本とした経路によって合成された。これらの単位の C-末端でのグリシン残基の配置は、活性化されたペプチドフラグメントの固相結合中のラセミ化（アズラクトン形成を経た）に起因する問題を回避した。トリペプチド単位は

(13)

特表2001-514189

、標溶液相方法 (Bodanszky, 1994) を使用して合成された。この単位は、Fmoc が、グリシン残基の脱保護に必要な Pd/C-触媒化水素化分解に耐える事が出来ないの、Fmoc 保護基ではなくて N^ε-tert-ブチルオキシカルボニル (Boc) と共に組立てられた。

FmocProFlyGlyOH (1) の合成に使用された合成経路は図2に示される。

要するに、BocFlpOSuとGlyOBnとの反応は、保護されたジペプチドを生成した。酸性ジオキサン中でのBoc基の除去と、それに続くBocProOHとの結合によって、保護されたトリペプチドが与えられる。水素化分解によるベンゾイル基の除去は、(1) のBoc類似体を生成し、この物は、Boc基の除去とFmocOSuとの反応とによって(1)に転換された。トリペプチドの合成で使用された全ての試薬は市販品のものが利用できる。

【0015】

【表2】

表2：コラーゲン擬似物の合成で使用されたトリペプチド単位

	位置1	位置2	位置3
1	FmocPro-	Flp-	GlyOH

コラーゲンの一本鎖を擬態するペプチドは、トリペプチド(1)の固相結合によって合成された。周囲温度では安定である三重螺旋に対して、夫々の鎖は、少なくとも7つのトリペプチド反復を含まねばならない。夫々の鎖が10のトリペプチド単位を含むコラーゲン擬似物が合成された。この30量体は、Fmocアミノ酸との固相合成を受入れ易く、且、側鎖を持たない樹脂からのポリペプチドの切断或いはα-アミノ基の脱保護を許す2-クロロトリチル樹脂上で合成された (Fields and Noble, Int. J. Pept. Protein Res., 37:513-520 (1990))。

Fmoc(ProFlpGly)₁₀-OHを合成する為に使用された経路は図3に示される。要するに、市販の2-クロロトリチル樹脂がピペリジンで脱保護され (Barlos et al., Int. J. Pept. Protein Res., 38:555-562 (1991))、DCCとヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) を使用してFmocProFlpGlyOHと結合させて樹脂-結合トリペプチドを得た。この脱保護及び結合

(14)

特表2001-514189

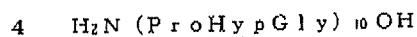
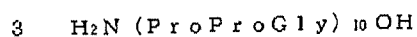
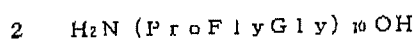
工程は、9個の付加単位が付加されるまでトリペプチドと共に繰返された。得られた30量体単位は脱保護されて、遊離酸として2が得られた(表3)。30量体ペプチド3及び4は、Peptides International製であった。

【0016】

【表3】

表3：コラーゲンの鎖を擬態する30量体ペプチド。単位2、3又は4から成る

三重螺旋は、コラーゲンの安定性の熱力学測定のために使用された。



三重螺旋の安定性

コラーゲンの三重螺旋構造は、225nmにピークシグナルを持つ特異な円偏光二色性(CD)を有する。図1は、図中に示された(ProProGly)₁₀と(ProHypGly)₁₀のCDスペクトルと一緒に(ProFlpGly)₁₀のCDスペクトルを示す。これら三つのコラーゲン擬似物の夫々は、コラーゲンの三重螺旋の特徴である225nmにおける強力なシグナルを有する。

2-4のペプチドで形成された螺旋の溶融温度(T_m)は、温度の関数として225nmにおけるCDシグナルを観察する事によって、Long et al., Biochemistry, 32:11688-11695, (1993)の方法によって決定した。この三つのコラーゲン関連三重螺旋(80μM)の熱変性は、コラーゲンの安定性評価のための一般的な条件である50mM酢酸中で行われた。この実験の結果は表4に纏めて示される。(ProFlpGly)₁₀コラーゲン擬似物は、(ProProGly)₁₀と(ProHypGly)₁₀よりも一層大きな熱安定性を有し、この事は、コラーゲン三重螺旋の安定性が誘起効果に関連すると言う本発明者の仮説と一致するものである。又、表4には、この三つのコラーゲン擬似物の夫々の自由エネルギー変化が示される。これらの値は、Becktel and Schellman, Biopolymers 26:1859-1877 (1987)の方法によって得られた。

【0017】

【表4】

(15)

特表2001-514189

表4：フルオロプロリンは、三重螺旋コラーゲンを極めて安定にする

鎖	T _m (°C)	ΔΔG _m (kcal/mol)
(ProFlpGly) ₁₀	91	11
(ProHypGly) ₁₀	69	6.5
(ProProGly) ₁₀	41	0

各Hyp残基：6.5kcal/mol ÷ 30 = 0.2kcal/mol

各Flp残基：11kcal/mol ÷ 30 = 0.4kcal/mol

これらの結果は、Flpのフッ素原子の電子引込み能力がコラーゲン三重螺旋の安定性を増加させる事を示す。コラーゲン中のヒドロキシプロリンのヒドロキシル基を変性してヒドロキシル基の電子引込み能力を増加させる事は、コラーゲンの安定性の増加をもたらす事が期待される。理想的には、化学的変性は、(1) ヒドロキシル基をより一層電子引込み性とすべきであり、(2) 互いに対して三重螺旋の充填を妨害しない様に小さくしなければならず、(3) 互いに対して三重螺旋の充填を妨害しない様に無電荷でなければならない。極めて有用な変性としては、アセチル基、メシル(メタンスルホニル)基、又はトリフルオロメチル基のヒドロキシル基への付加が挙げられる。

【0018】

安定性の増加したコラーゲンを得る為の天然コラーゲンの化学的変性は、次の様にして得る事が出来る。要するに、天然コラーゲンは有機溶媒に溶解される。選択の溶媒は、(コラーゲンを溶解させる為に)極性である。これらの特徴を有する溶媒の一つはピリジンである。コラーゲンの溶液は、化学的変性試薬の溶液と一緒にする事が出来ると考えられる。アセチル基の付加を望む場合は、変性試薬は塩化アセチルである事が出来る。メシル基を付加させたい場合は、変性試薬は塩化メシルである事が出来る。トリフルオロメチル基を付加させたい場合は、変性試薬はトリフルオロメチルヨードである事が出来る。又、これら試薬の夫々は、コラーゲン上のその他のヒドロキシル基及びアミノ基を変性する事が出来る。これは、コラーゲンの安定性にとって有害であるかも知れない。然しながら、全体の効果は安定性の増加となる事が予測される。

【図面の簡単な説明】

(16)

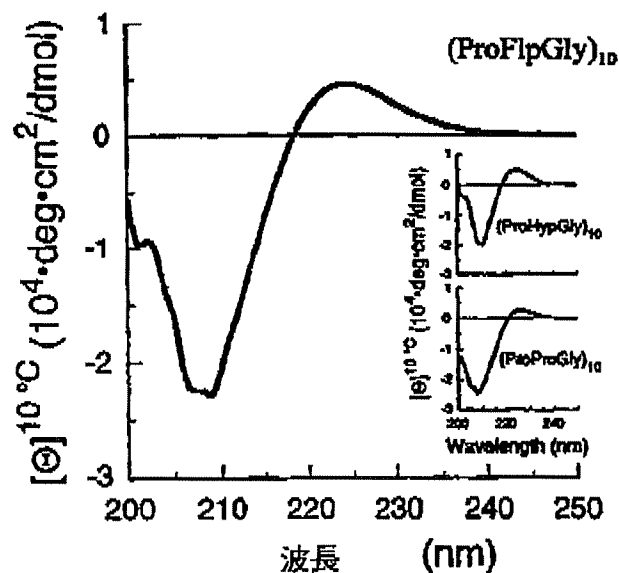
特表2001-514189

【図1】 $(\text{Pro-Flp-Gly})_{10}$ 、 $(\text{ProProGly})_{10}$ 及び $(\text{ProHypGly})_{10}$ の円偏光二色性スペクトルを示す。

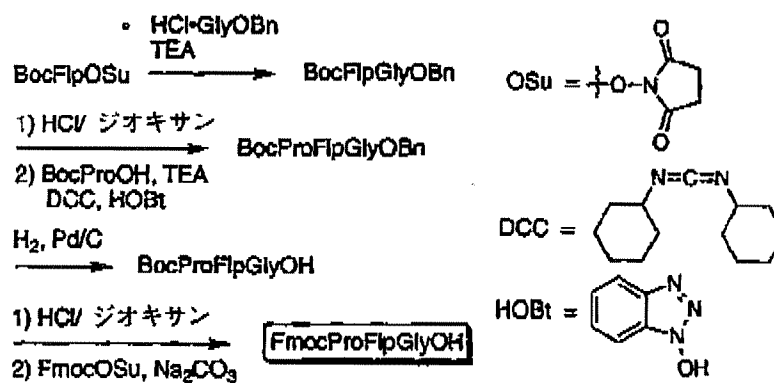
【図2】 FmocProFlpGlyOH の製造の為の合成経路を示す。

【図3】 $(\text{ProFlpGly})_{10}$ の製造の為の合成経路を示す。

【図1】



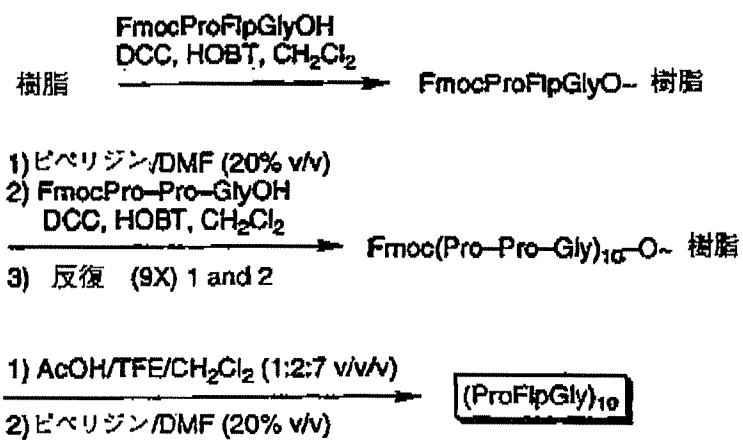
【図2】



(17)

特表2001-514189

【図3】



(18)

特表2001-514189

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

No. National Application No.
PCT/US 98/14284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/78 A61K38/39		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (names of data bases and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	HOLMGREN, STEVEN K. ET AL: "Code for collagen's stability deciphered" NATURE (LONDON) (1998), 392(6677), 666-667 CODEN: NATUAS; ISSN: 0028-0836, 1998, XP002083752 see the whole document	I-12
X	WEBER, ROLF W. ET AL: "The effect of O-acetylation on the conformational behavior of the collagen model peptide (L-pro-L-hyp-gly) ₁₀ and gelatin" HELV. CHIM. ACTA (1978), 61(2), 701-8 CODEN: HCACAV; ISSN: 0018-019X, 1978, XP002083753 see page 705, paragraph 1 - page 706, paragraph 1	7-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document not published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 November 1998		Date of mailing of the international search report 27/11/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2016, Postfach 2 M, 52800 HANNOVER Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 21 651 epo ml, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuhr, C

Form PCT/ISA/210 (copy on sheet July 1993)

(19)

特表 2001-514189

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/US 98/14284

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>E.S. EBERHARDT ET AL.: "Inductive Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization: Implications for Collagen Folding and Stability" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 118, no. 49, 11 December 1996, pages 12261-12266, XP002083754 DC US cited in the application see page 12265, left-hand column, paragraph 2 see page 12265, left-hand column, paragraph 4 see page 12665, right-hand column, paragraph 1</p>	1-12

1

Form PCT/ISearch (Continuation of second phase) (July 1993)

page 2 of 2

(20)

特表2001-514189

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GR, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

Fターム(参考) 4C081 AA12 AB19 BA12 BB08 CC04
CD111 CD122 DA02
4C084 AA03 BA02 BA04 BA07 BA31
CA59 DA40 MA27 MA63 NA14
ZA891
4H045 AA10 BA05 BA12 FA34 FA33
FA61 GA25